

Maria Alice Varjal de Melo Santos<sup>1</sup>; Lêda Narcisa Regis<sup>1</sup>; Constancia Flavia Junqueira Ayres Lopes<sup>1</sup>; Claudia Maria Fonte de Oliveira<sup>1</sup>; Rosângela Maria Rodrigues Barbosa<sup>1</sup>; Duschinka Ribeiro Duarte Guedes<sup>1</sup>; Gabriel da Luz Wallau<sup>1</sup>; Karitas Farias Alves Lima<sup>1</sup>; Luisa Maria Inácio da Silva<sup>1</sup>; Carlos Messias de Mendonça<sup>1</sup>; Marina Praxedes Rodrigues<sup>1</sup>; Antonio Emanuel Holanda Dias Cavalcanti<sup>1</sup>; Edvane Borges da Silva<sup>2</sup>; Sloana Giesta Lemos Florêncio<sup>2</sup>; Marcelo Henrique Santos Paiva<sup>3</sup>; Renato Lira Barbosa<sup>4</sup>; Jurandir Alves de Almeida Junior<sup>2</sup>; Vânia do Nascimento Nunes<sup>5</sup>; Liliane Barbosa Amorim<sup>5</sup>; Maria de Fátima Marinho de Souza<sup>6</sup>; Rebeca Dias<sup>6</sup>; Fernando Jorge Rodrigues Magalhães<sup>6</sup>; Eduardo Guelfer Ferrer de Moraes<sup>6</sup>; Luiz Eduardo Antunes<sup>7</sup>; Claudia Rohde<sup>8</sup>; Cicero Jorge Verçosa<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ-PE. Recife-PE, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Energia Nuclear da UFPE. Recife-PE, Brasil

<sup>3</sup>Núcleo de Ciências da Vida, Centro Acadêmico do Agreste da UFPE. Caruaru-PE, Brasil <sup>4</sup>MULTIAVE Produtos Agropecuários, PCO's e Saúde Ambiental. Recife-PE, Brasil

<sup>5</sup>Secretaria de Saúde do Recife - CVA. Recife-PE, Brasil

<sup>6</sup>Secretaria de Saúde do Distrito Estadual de Fernando de Noronha. Vila dos Remédios-PE, Brasil <sup>7</sup>Administração do Distrito Estadual de Fernando de Noronha. Vila dos Remédios-PE, Brasil

<sup>8</sup>Núcleo de Biologia, Centro Acadêmico de Vitória da UFPE. Vitória de Santo Antão-PE, Brasil.

#### Instituição:

Departamento de Entomologia/Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz-PE

#### Correspondência

Maria Alice Varjal de Melo Santos  
Av. Prof. Moraes Rego s/n, Campus UFPE  
- Cidade Universitária, Recife-PE, 50740-465, Brasil.  
marvarjal@cpqam.fiocruz.br

## Tecnologias integradas para controle biológico, mecânico e genético de *Aedes aegypti*

### Integrated technologies for biological, mechanical and genetic control of *Aedes aegypti*

#### RESUMO

Duas tecnologias alternativas para o controle de *Aedes aegypti* foram avaliadas: a aplicação espacial de larvicida biológico-Bti em potenciais criadouros peridomiciliares, e a liberação de machos estéreis para inviabilização reprodutiva das fêmeas do mosquito. As ações foram realizadas pelos Agentes dos Serviços de Saúde em 15 vilas da Ilha de Fernando de Noronha, e em uma área (900 imóveis) no bairro da Várzea/Recife/Pernambuco. A efetividade dos métodos foi avaliada por indicadores entomológicos, estimados pela presença, quantidade e viabilidade de ovos do mosquito, coletados em armadilhas, e por marcadores genéticos. A aplicação de Bti, com atomizador costal, ocorreu a cada 30 dias em ambas as áreas. Uma redução importante e sustentável da população de *A. aegypti*, por este método, foi alcançada em 2015/2016 na Várzea e, em 2016, na Ilha, onde a remoção de 18 toneladas de resíduos sólidos em 2015 contribuiu possivelmente para os resultados. Machos esterilizados com radiação gama foram produzidos em massa no laboratório e liberados em uma das vilas da Ilha. A análise espaço-temporal dos indicadores, de dez/2015 a ago/2016, revelou redução expressiva da densidade populacional do mosquito e da diversidade genética da população local. Ambas as abordagens parecem ter reduzido o contato homem-vetor e os riscos de transmissão de arboviroses na Ilha, apesar da elevada competência vetorial da população local do mosquito para os vírus Zika e Dengue. Os métodos testados se mostraram eficientes e passíveis de serem integradas às ações do SUS voltadas ao controle de *A. aegypti*.

**Palavras-chave:** *Bacillus thuringiensis israelensis*; técnica do macho estéril; eliminação de ovos; controle vetorial

#### ABSTRACT

Two alternative technologies were evaluated for *Aedes aegypti* control: the spraying of a biological larvicide (Bti) in potential peridomestic breeding sites and the release of sterile males to promote reproduction blockage in wild females. Actions were carried out by Agents of the Health Services, in 15 villages of the Fernando de Noronha Island and

in 900 properties from the district of Várzea, Recife-PE. The effectiveness of both methods was evaluated by entomological indicators, estimated by the presence, quantity and viability of eggs from the mosquito collected in traps and through genetic markers. Bti was delivered by backpack sprayer every 30 days in both areas. A significant and sustainable reduction of the *A. aegypti* population as a result of this technique was achieved in 2015/2016 in Várzea and in 2016 in the Island, where it was strengthened by the removal of 18 tons of solid waste in 2015. Males sterilized with gamma radiation were mass-produced in the laboratory and released in one village of the Island. The spatiotemporal analysis of the indicators, from Dec/2015 to Aug/2016, revealed a significant reduction in mosquito density, which impacted on the genetic diversity of the local population. Both approaches seem to have reduced human-vector contact and the risk of arbovirus transmission in the Island, although local mosquito population presented high vector competence to Zika and Dengue virus. These methods were efficient and could be integrated into SUS actions directed to *A. aegypti* control.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis israelensis*; sterile male technique; egg elimination; vector control

## OBJETIVOS

*Aedes aegypti* é uma das espécies de mosquito de maior importância epidemiológica na transmissão de arboviroses nos ambientes urbanos, cujo controle, realizado há cerca de 20 anos no Brasil continua sendo um grande desafio para a saúde pública. O presente estudo teve como objetivos avaliar, pela primeira vez no país, a efetividade e viabilidade operacional de duas tecnologias distintas para o controle biológico, mecânico e genético do mosquito *Aedes aegypti*, na rotina dos serviços de controle vetorial.

## MÉTODOS

O estudo foi predominantemente conduzido na Ilha de Fernando de Noronha (FN) (03°54'S e 32°25'O), localizada a 545 km da costa do Recife, considerada Área de Proteção Ambiental (APA), estado de Pernambuco, Brasil. A ilha é composta por 15 vilas distribuídas em 17, 017 km<sup>2</sup>, possui aproximadamente 4.000 habitantes e 1.112 imó-

veis. Além da Ilha foi trabalhado um estrato de 900 imóveis no bairro da Várzea/Recife (8°2'S e 34°57'O), Pernambuco. Ambas as áreas foram selecionadas por apresentarem uma ampla distribuição do mosquito *A. aegypti*<sup>1</sup>.

Duas tecnologias alternativas para o controle de *A. aegypti* foram avaliadas: a aplicação espacial do larvicida biológico *Bacillus thuringiensis israelensis* (Atomização-Bti) em criadouros potenciais, de pequeno porte, presentes nas áreas peridomiciliares, e a técnica do inseto estéril (TIE), baseada na liberação de machos estéreis para inviabilização reprodutiva das fêmeas selvagens do mosquito. As abordagens selecionadas atingem diferentes fases do desenvolvimento do mosquito e têm em comum a elevada especificidade, seletividade e segurança ambiental.

A primeira fase do projeto estabeleceu as colaborações entre os Departamentos de Entomologia/IAM/FIOCRUZ-PE e Energia Nuclear/UFPE, e as

parcerias com os Gestores das Secretarias de Saúde do Recife do Distrito de Fernando de Noronha e a Empresa MULTIAVE, para discutir a execução do projeto. Na sequência, buscou-se a anuência do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/MA/FN), bem como a adesão da população local, após esclarecidos os objetivos, metodologias, riscos/benefícios e resultados esperados com as novas ações de controle. As equipes de campo dos Serviços de Controle Vetorial da Vigilância Ambiental do SUS, representadas pelos Agentes de Saúde Ambiental (ASA), Agentes de Controle de Endemias (ACE) e supervisores foram treinadas nas diferentes metodologias e no manuseio e formas de calibração de seus instrumentos.

O produto à base de Bti, VectoBac®WG (SUMITOMO), já utilizado para o tratamento dos grandes reservatórios de água nas duas áreas, foi diluído em água e aplicado em ultra-baixo volume (UBV-leve), por atomizador costal motorizado, nas áreas peridomiciliares dos imóveis (Figura 1), a cada 30 dias. A ação foi realizada pelos ASA e ACE, após sua capacitação pela empresa MULTIAVE, cobrindo a área da Várzea e 14 das 15 vilas de Fernando de Noronha.

A implantação da TIE foi realizada em três etapas: a primeira em laboratório, realizada no Insetário do Depto. Entomologia (IAM/FIOCRUZPE), definiu a melhor fase para manipulação dos mosquitos; a dose de radiação gama mais eficaz para a esterilização, a relação dose/fitness reprodutivo/longevidade dos machos e a produção em massa dos machos estéreis (ME). No Depto. de Energia Nuclear/UFPE foi utilizado o irradiador de Cobalto 60 (Gammacell modelo 220 Excel-MDS Nordion) para esterilizar os machos de *A. aegypti*; e no Centro Acadêmico de Vitoria/UFPE foram realizados testes de genotoxicidade, utilizando marcadores moleculares, para verificar a eficácia da técnica de esterilização dos machos, cuja análise revela o nível de dano sofrido pelo DNA, após exposição à radiação gama.

Na segunda etapa, em condições simuladas de campo, foram feitos testes para conhecer a competitividade dos ME para o acasalamento; a taxa de inviabilidade de ovos/dose de radiação e a melhor proporção de ME para uso em campo. Todos os parâmetros foram estimados a partir da fertilidade das fêmeas do mosquito.

A terceira e última etapa envolveu a análise do histórico de infestação por *A. aegypti* em cada vila de FN a partir de dados recolhidos pelo SMCP-Aedes<sup>1</sup>; a seleção de uma vila estratégica para o teste piloto com os ME; a estimativa do número de ME/soltura, como base nos dados entomológicos e outras variáveis de ocupação territorial. Por fim, foi definida a logística para o envio dos ME para a Ilha, com a importante colaboração das Companhias Aéreas locais.

A efetividade dos métodos de controle foi avaliada por indicadores entomológicos, estimados pela presença, quantidade e viabilidade de ovos do mosquito, coletados por uma rede de armadilhas (ovitampas). As informações foram usadas para a análise espaço-temporal da densidade de ovos de *A. aegypti* e a produção de mapas Kernel para identificação dos pontos de maior infestação nas áreas, seguindo a metodologia descrita em Regis et al.<sup>1</sup>. Em Fernando de Noronha, na vila selecionada para a liberação dos ME também foi utilizado como parâmetro de avaliação a estimativa da diversidade genética da população de *A. aegypti*, em amostras coletadas antes e durante o período de implementação da TIE.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O monitoramento espaço-temporal de *A. aegypti* nas áreas de estudo revelou que após os ciclos contínuos de atomização-Bti, com larga cobertura da área peridomiciliar na Várzea, em 2015/2016, houve uma redução expressiva da densidade anual de ovos do mosquito, revelando uma diminuição da intensidade da infestação na área. Na Ilha, a atomização-Bti foi realizada de forma contínua do final de 2015 até agosto/2016 e, de maio a junho deste mesmo ano, foi realizado um mutirão para a remoção mecânica de 18 toneladas de resíduos sólidos, considerados criadouros potenciais do mosquito. É possível que o somatório destas ações em Fernando de Noronha tenha levado a uma redução importante do número médio de ovos/ovitrampa, revelada pelo acompanhamento da densidade populacional de *A. aegypti*. Estes resultados sugerem a efetividade de controle da espécie associada à ampliação da cobertura de tratamento de microcriadouros, nos dois contextos urbanos estudados. Experiências recentes de sucesso com esta abordagem já foram descritas para controle de *A. aegypti* e *A. albopictus* em outros países<sup>2,3,4</sup>.

As duas primeiras etapas, consideradas precursoras da implantação da TIE, revelaram a eficácia da radiação gama para a esterilização dos machos, sem haver um comprometimento significativo da sua competitividade para o acasalamento<sup>5</sup>, aspecto também referido em estudos realizados com *A. albopictus*<sup>6</sup>. O Ensaio Cometa gerou um perfil que poderá ser utilizado para o controle da eficiência do método de esterilização e, conseqüentemente, da qualidade do material biotecnológico produzido.

Quanto à produção em massa dos mosquitos, é possível afirmar que o procedimento é simples, de baixo custo e que pode ser realizado em locais com condições mínimas de insetário. As pupas-macho podem ser triadas mecanicamente, em função do tamanho, e obtidas em até 10 dias após a eclosão das primeiras larvas. Experiências de biofábricas no Brasil com *A. aegypti* transgênicos confirmam a factibilidade de produção desta espécie em larga escala<sup>7,8</sup>. Os testes de acasalamento, em condições simuladas de campo, revelaram que a dose de radiação gama testada promoveu percentuais elevados de inviabilidade dos espermatozoides, efeito constatado nos ovos provenientes das fêmeas cobertas pelos ME5. Outros estudos já revelavam a eficácia desta radiação ionizante para outras espécies de mosquitos<sup>9</sup>.

A TIE se mostrou eficiente na redução da viabilidade dos ovos de *A. aegypti* também em campo, promovendo supressão nas gerações seguintes, no período de dez/2015 até ago/2016, confirmada tanto pelos indicadores entomológicos<sup>10</sup> quanto pelos marcadores genéticos. Foi observada uma tendência à oscilação na taxa de

inviabilidade de ovos, o que pode estar relacionado a diversos fatores, entre eles, a existência de um grande estoque de ovos quiescentes<sup>1,10,11</sup> no ambiente, o qual repõem machos e fêmeas selvagens na área de liberação dos ME. Estudos desenvolvidos nos últimos cinco anos, na Itália e na Ilha Reunião, corroboram esta afirmativa para o controle de *A. albopictus*<sup>12,13</sup>, espécie invasora tal como *A. aegypti* também presente no Brasil<sup>14</sup>.

As análises indicam a eficiência das duas abordagens testadas neste estudo para o controle complementar de *A. aegypti* e destacam a necessidade de sua integração às ações do Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Sugerem ainda, que as densidades de *A. aegypti* encontradas nas áreas depois das intervenções podem ter reduzido o contato homem-vetor, minimizando as chances de transmissão vetorial das arboviroses. Tal informação é de grande relevância, uma vez que ensaios em laboratório com fêmeas de *A. aegypti* de Fernando de Noronha demonstraram que elas são capazes de transmitir o ZIKV, três dias após a sua infecção<sup>15</sup>. Estudos anteriores a este já revelavam sua competência e capacidade vetorial para o vírus Dengue<sup>16</sup>.

Diante da importante participação do mosquito *A. aegypti* nos ciclos de transmissão da dengue, zika e chikungunya, evidenciado na tríplice epidemia que atingiu o Brasil em 2015/2016<sup>15</sup>, esta experiência aponta para novas possibilidades de controle do mosquito, com vistas a garantir que as ações do SUS possam ampliar a proteção das populações humanas nas áreas endêmicas.



Figura 1. Exemplos de áreas peridomiciliares/quintais encontrados na Ilha de Fernando de Noronha/Pernambuco, onde foram feitas aplicações espaciais (atomização) do larvicida biológico Bti, para o controle do mosquito *Aedes aegypti*, em 2015/2016. Fonte: os autores.

## COLABORAÇÃO DOS AUTORES:

Concepção e desenho dos experimentos: MAVMS, LNR, CFJAL, CMFO, EBS, MHSP, CR, RLB; realização dos experimentos: DRDG, KFAL, LMIS, CMM, MPR, SGLF, CJV; Análise dos dados: MAVMS, EBS, DRDG, CJV, GLW, AEHDC, MHSP; capacitação e coordenação das equipes de campo: MAVMS, CMFO, RLB, JAAJ, VNN, LBA, MFMS, RD, FJRM, EGFM, LEA; escrita do artigo: MAVMS, CFJAL, CMFO, EBS, MHSP, RMRB, GLW, AEHDC, MHSP.

## AGRADECIMENTOS

Aos Agentes de Saúde Ambiental, Agentes de Controle de Endemias, supervisores das Secretarias de Saúde do Recife e Fernando de Noronha e demais colaboradores, nossos agradecimentos pelas contribuições dadas para a realização deste projeto. À FACEPE (processo n°: APQ-0345-2.13/13) e ao MS/DECIT/Programa Pesquisa para o SUS pelo suporte financeiro.

## REFERENCES

1. Regis LN, Acioli RV, Silveira-Jr JC, Melo-Santos MAV, Cunha MC, Souza F, et al. Characterization of the spatial and temporal dynamics of the dengue vector population established in urban areas of Fernando de Noronha, a Brazilian oceanic island. *Acta Trop*. 2014; 137: 80–87.
2. Williams GM, Faraji A, Unlu I, Healy SP, Farooq M, Gaugler R, et al. Area-Wild Ground Applications of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the control of *Aedes albopictus* in residential neighborhoods: from optimization to operation. *PLoS One*. 2014; 9(10): e110035.
3. Tan AWA, Loke SR, Benjamin S, Lee HL, Chooi KH, Sofian-Azirun M. Spray application of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti strain AM65-52) against *Aedes aegypti* (L.) and *Ae. albopictus* Skuse populations and impact on dengue transmission in a dengue endemic residential site in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2012; 43(2): 296-310.
4. Lee HL, Chen CD, Masri SM, Chiang YF, Chooi KH, Benjamin S. Impact of larviciding with a *Bacillus thuringiensis israelensis* formulation, VectoBac WG, on dengue mosquito vectors in a dengue endemic site in Selangor State, Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2008; 39(4): 601-609.
5. Lima, KFA. Avaliação biológica de machos esterilizados por radiação gama, para utilização em programas de controle populacional de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) [dissertação]. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2015.



6. Madakacherry O, Lees RS, Gilles JR. *Aedes albopictus* (Skuse) males in laboratory and semi-field cages: release ratios and mating competitiveness. *Acta Tropica*, 2013; 132 (Supp.): S124-S129.
7. Carvalho DO, Nimmo D, Naish N, McKemey AR, Gray P, Wilke AB, et al. Mass production of genetically modified *Aedes aegypti* for field releases in Brazil. *J Vis Exp*. 2014; 83: e3579.
8. Carvalho DO, McKemey AR, Garziera L, Lacroix R, Donnelly CA, Alphey L, et al. Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(7): e0003864.
9. Oliva CF, Damiens D, Vreysen MJ, Lemperière G, Gilles J. Reproductive strategies of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and implications for the sterile insect technique. *PLoS One*. 2013; 8(11): e78884.
10. Florêncio SGL. Potencial do uso de machos esterilizados por radiação gama (60CO) para o controle populacional de *Aedes aegypti* (Diptera - Culicidae): um caminho biotecnológico do laboratório para o campo [Tese]. Departamento de Energia Nuclear/ Universidade Federal de Pernambuco, 2017.
11. Diniz DFA, Albuquerque CMR, Oliva LO, Melo-Santos MAV, Ayres CFJ. Diapause and quiescence: dormancy mechanisms that contribute to the geographical expansion of mosquitoes and their evolutionary success. *Parasit Vectors*. 2017; 10(1): 310.
12. Bellini R, Medici A, Puggioli A, Balestrino F, Carrieri M. Pilot field trials with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian urban areas. *J Med Entomol*. 2013; 50(2): 317-325.
13. Oliva CF, Jacquet M, Gilles J, Lemperière G, Maquart PO, Quilici S, et al. The sterile insect technique for controlling populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: mating vigour of sterilized males. *PLoS One*. 2012; 7(11): e49414.
14. Santos RLC. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002). *Rev Saúde Pública*. 2003; 37(5): 671-673.
15. Guedes DRD, Paiva MHS, Donato MMA, Barbosa PP, Krokovsky L, Rocha SWDS, et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerg Microb Infect*. 2017; 6(8): e69.
16. Barbosa PP, Guedes DRD, Melo-Santos MAV, Cordeiro MT, Acioli RV, Batista CAV, et al. Vector surveillance for dengue virus detection in the Archipelago of Fernando de Noronha, Brazil. *J Med Entomol*. 2016; 53(3): 613-619.

Artigo baseado na dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde/Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE (2015), intitulada “Avaliação biológica de machos esterilizados por radiação gama, para utilização em programas de controle populacional de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)” e em uma tese apresentada ao Programa de Tecnologias Energéticas e Nucleares/Universidade federal de Pernambuco (2017), intitulada “Potencial do uso de machos esterilizados por radiação gama (60CO) para o controle populacional de *Aedes aegypti* (Diptera - Culicidae): um caminho biotecnológico do laboratório para o campo”.